

Empleo de marcadores isoenzimáticos para el estudio de la variabilidad genética en especies y clones de importancia alimentaria en Cuba.

Clara González¹, María Isabel Román², Marilyns Milián², Yoel Beovides², Xonia Xiqués¹, Marlyn Valdés¹, Maruchi Alonso³ y Rosa Acosta⁴.

¹*Facultad de Biología, Universidad de La Habana*

e-mail: lfcg@fbio.uh.cu

²*Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT)*

³*Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical*

⁴*Instituto de Ciencias Agrícolas (INCA)*

RESUMEN.

Se empleó la técnica electroforética en gel de poliacrilamida (PAGE) para diferentes sistemas isoenzimáticos en el estudio de la variabilidad genética de las colecciones de los Bancos de Germoplasma de malanga (*Xanthosoma* spp.) y plátanos (*Musa* spp.), Así como en el análisis de clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) obtenidos por la vía tradicional de estacas y las técnicas biotecnológicas de micropropagación y embrionía somática.

Los datos fueron procesados mediante el paquete de programas MAT-GEN y una matriz de similitud por un análisis de conglomerado (*Cluster*). El dendrograma muestra la formación de grupos de afinidad para la malanga y los plátanos, mientras que en el caso de la yuca se empleó el índice de similitud de Vaughan y Denford y posteriormente se compararon los valores con la prueba "t" de porcentajes. El análisis cuantitativo de los zimogramas demostró el polimorfismo observado en los sistemas isoenzimáticos para las especies y clones de malanga ya que de un total de 87 bandas analizadas el 98.9% son polimórficas esto se debe a que existen varios grupos como son los blancos, amarillos y morados; para los plátanos de 35 bandas sólo el 45.7% son polimórficas y esto es debido a que estos clones pertenecen a un mismo subgrupo (ABB). Los resultados en yuca, mostraron que no existen diferencias significativas entre los clones obtenidos por las diferentes técnicas, lo que permite emplear los métodos biotecnológicos para la propagación acelerada de este material.

INTRODUCCION

Las colecciones y los bancos de germoplasma, son las fuentes más importantes de intercambio de materiales a emplear para las pruebas de variedades locales y regionales, constituyendo el punto de partida en los programas de mejoramiento genético. Además, los recursos fitogenéticos constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria mundial y directa o indirectamente, contribuyen al sustento de todas las personas en la tierra (Esquinas-Alcázar, 1982; FAO, 1996).

El estudio de la variabilidad genética y su patrón de distribución, son herramientas esenciales en la conservación del germoplasma y en el desarrollo de los programas de cruzamiento. Las técnicas isoenzimáticas juegan un papel fundamental en el estudio de los recursos fitogenéticos, ya que han probado su utilidad y complementación con los análisis morfoagronómicos, para establecer las afinidades genéticas entre los taxa, detectar la posible presencia de duplicados, apoyar la selección de materiales promisorios, conocer el grado de variabilidad genética presente en cultivos obtenidos por técnicas biotecnológicas y tradicionales, así como demostrar el origen híbrido de algunos materiales (Sanchez-Yelamo y Martínez-Laborde, 1991; Aradhaya y col, 1994; Diosdado, 1997; González, 2003).

En Cuba, dado el desarrollo de la agricultura y del programa alimentario nacional, el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT) y el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, han llevado a cabo diversos trabajos de caracterización y evaluación del germoplasma de diferentes cultivos de interés, como los plátanos (*Musa* spp.), malanga (*Xanthosoma* spp.) y yuca (*Manihot esculenta* Crantz.), mediante el empleo de las técnicas electroforéticas para isoenzimas y proteínas totales.

MATERIALES Y METODOS

Para los estudios isoenzimáticos, se emplearon extractos foliares de 10 clones de plátano (*Musa spp*), 3 clones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz), sometidos a diferentes métodos de propagación: estacas, cultivo de meristemas y embriogénesis somática, así como 71 clones de la colección cubana de malanga (*Xanthosoma spp.*). Se realizaron las corridas electroforéticas en gel de poliacrilamida (PAGE) en lámina vertical y un sistema de buffers discontinuos, para diferentes sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales (González, 1989), de acuerdo al material vegetal estudiado (Tablas 1, 2 y 3a 3b, 3c). Los sistemas proteicos analizados para cada material vegetal, se muestran en la Tabla 4.

En la Tabla 5 aparecen los métodos de tinción empleados para los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales.

Los datos electroforéticos de la malanga y los plátanos fueron procesados mediante el paquete de programas MAT-GEN (Sigarroa y Cornide, 1995), para obtener la matriz de similitud a partir del índice de Apóstol, la cual fue estudiada por un análisis de conglomerados (*Cluster*) (Daviers, 1973). En el caso de la yuca se empleó el índice de similitud de Vaughan y Denford (1968) y posteriormente se compararon los valores con la prueba "t" de porcentajes (Sokal y Rohlf, 1969)

RESULTADOS Y DISCUSION

Plátanos: En general se observaron pocas diferencias entre los clones estudiados, ya que el número de bandas comunes en los electroforetograma fue alto. El sistema isoenzimático esterasas y las proteínas totales permitieron una mayor diferenciación y demostraron que no existen clones duplicados. Estos resultados coinciden con las relaciones genéticas del material, ya que pertenecen al mismo grupo genómico, según lo planteado por Rodríguez Nodal en 1986.

El empleo del análisis multivariado, combinado con los estudios isoenzimáticos en clones de *Musa spp.*, brindan una importante información para el mejoramiento genético del cultivo ya que se pudieron diferenciar y seleccionar los genotipos deseados. El dendrograma aparece en la Figura1.

Malanga (*Xanthosoma*): El estudio de las isoenzimas y proteínas totales, permitió separar los clones de malanga en los grupos blanco, amarillo y morado (Figs. 2,3,4). Estos resultados brindan por primera vez, la caracterización molecular de todos los clones según su grupo, mediante la determinación de los zimotipos y proteinogramas, los que aportan nuevos datos a la caracterización de este género.

Yuca (*Manihot esculenta* Crantz): Los sistemas esterasas, peroxidasas y las proteínas totales no mostraron diferencias significativas entre los clones "Señorita", "CMC-76" y "CEMSA 74-725", para los métodos de estacas, cultivo de meristemos y embriogénesis somática, aspecto que se evidencia en la presencia de un gran número de bandas comunes y un alto índice de similitud (Tablas 6 y 7). Esto indica que las técnicas biotecnológicas empleadas para la propagación de la yuca no introdujeron una variabilidad genética apreciable, ya que no hubo diferencias marcadas en los patrones genético-bioquímicos evaluados.

CONCLUSIONES

-Los estudios isoenzimáticos permitieron establecer las afinidades genéticas de las accesiones de los bancos de germoplasma de plátanos, malanga y los clones de yuca propagados por diferentes métodos.

-Los sistemas más polimórficos resultaron ser las esterasas y las proteínas totales.

-La técnica empleada en estos estudios, puede ser aplicada en la evaluación de otras colecciones, para la determinación de la posible presencia de variabilidad genética en materiales obtenidos por cultivo *in vitro* y puede ser utilizada por las diferentes biofábricas del país, para monitorear la presencia de variación somaclonal.

Tabla 1. Clones de plátanos Burro analizados.

CLONES DE PLÁTANOS	NOMENCLATURA
'Burro CEMSA'	CE
'Burro criollo'	Cri
'Burro cenizo'	Cen
'Burro enano'	En
'Burro vietnamita'	Vie

'Saba'	Sa
Somación de Saba	SS
'Pelipita'	P
'Siguatepeque'	Si
'Dubao'	Du

Tabla 2. Clones de yuca analizados, procedentes de diferentes métodos de propagación.

Clones	Campo (Estacas)	Cultivo de Meristemos	Embriogénesis somática
'CEMSA 74-725'	C	M	E
'Señorita'	C	M	E
'CMC-76'	C	M	E

Tabla 3 a. Clones del grupo Amarillo pertenecientes a la colección nacional de malanga del género Xanthosoma

No	N.Introd.	Clones	Color de la masa	Nomenclat	Procedencia
1	1466	Encintada	Amarillo (A-1)	E	Cuba
2	1475	De Seda	Amarillo (A-2)	DS	Cuba
3	1443	Amarilla-1	Amarillo naranja (A-3)	A-1	Cuba
4	1464	Amarilla -2	Amarillo (A-4)	A-2	Cuba
5	1480	Chopo Amarillo	Amarillo (A-5)	ChA	Cuba
6	1242	Amarilla Criolla-1	Blanco rosado (A-6)	AC-1	Cuba
7	1243	Amarilla	Amarillo (A-7)	A	Cuba
8	1255	Amarilla Ceniza	Amarillo naranja (A-8)	ACz	Cuba
9	1238	Amarilla Especial	Amarillo naranja (A-9)	AE	Cuba

10	1232	Amarilla Criolla	Amarillo naranja(A-10)	AC	Cuba
11	1261	Amarilla Especial-4	Amarillo (A-11)	AE-4	Cuba
12	1245	Belembe	Amarillo claro (A-12)	B	Guadalupe
13	1229	Amarilla Trinidad	Amarillo (A-13)	AT	Trin. Tobago
14	906	Amarilla Riza	Blanco rosado (A-14)	AR	Cuba
15	1460	Amarilla-3	Amarillo (A-15)	A-3	Cuba

Tabla 3 b. Clones del grupo Blanco pertenecientes a la colección nacional de malanga del género Xanthosoma

No	N.Introd.	Clones	Color de la masa	Nomenclat.	Procedencia
1	1471	Blanca –6	Blanco cremoso (B-1)	B-6	Cuba
2	1478	Americana	<i>Blanco cremoso (B-2)</i>	AM	Cuba
3	1436	Blanca –3	Blanco cremoso (B-3)	B-3	Cuba
4	1474	Blanca Morada	Blanco rosado (B-4)	ADA	Cuba
5	1445	Blanca- 4	Blanco cremoso (B-5)	B-4	Cuba
6	1457	Blanca –5	Blanco cremoso (B-6)	B-5	Cuba
7	1490	Blanca –9	Blanco cremoso (B-7)	B-9	Cuba
8	1482	Blanca –7	Blanco cremoso (B-8)	B-7	Cuba
9	1422	Blanca –1	Blanco cremoso (B-9)	B-1	Cuba
10	1427	Tricolor	Blanco cremoso(B-10)	T	Cuba
11	1460	Morada Ceniza	Blanco cremoso(B-11)	MCz	Cuba
12	1437	Picante	Blanco cremoso(B-12)	P	Cuba
13	1486	Blanca –8	Blanco (B-13)	B-8	Cuba
14	1244	Stoupan	Blanco (B-14)	ST	Guadalupe

15	1239	Javánica	Blanco cremoso(B-15)	J	Cuba
16	1230	Riza	Blanco (B-16)	R	Cuba
17	1262	Blanca Baracoa	Blanco (B-17)	BB	Cuba
18	1219	Blanca	Blanco (B-18)	Bca	Cuba
19	1256	Blanqui- Morada	Blanco rosado (B-19)	BqM	Cuba
20	1241	Blanca Venegas	Blanco (B-20)	BV	Cuba
21	1246	Viequera	Blanco cremos (B-21)	BM	Cuba
22	1247	Blanca Mutación	Blanco cremos (B-22)	BM	Cuba
23	1240	Macal Sport	Blanco (B-23)	MS	Cuba
24	1248	Blanca P. del Río	Blanco cremos (B-24)	BPR	Cuba
25	1259	Blanca Selección	Blanco cremos (B-25)	BS	Cuba
26	1267	Batabala blanca	Blanco cremos(B-26)	MB	Saot. Y Príncipe
27	1433	Blanca –2	Blanco (B-27)	B-2	Cuba
28	906	Amarilla Riza	Blanco rosado (B-28)	AR	Cuba
29	1594	Blanca –10	Blanco (B-29)	B-10	Cuba

Tabla 3 c. Clones del grupo Morado pertenecientes a la colección nacional de malanga del género Xanthosoma

No	N.Intro	Clones	Color de la masa	Nomenclat.	Procedencia
----	---------	--------	------------------	------------	-------------

.	d.				
1	1481	Morada –6	<i>Morado claro (M-1)</i>	M-6	Cuba
2	1428	Ceniza	Morado (M-2)	Cz	Cuba
3	1435	Morada –3	Morado (M-3)	M-3	Cuba
4	1470	Morada –5	Morado claro (M-4)	M-5	Cuba
5	1421	Morada –2	Morado (M-5)	M-2	Cuba
6	1450	Morada –4	Morado (M-6)	M-4	Cuba
7	1446	Sergio Cuarentena	Blanco rosado (M-7)	SC	Cuba
8	1485	Morada –7	Morado claro (M-8)	M-7	Cuba
9	1249	Morada1727	Rosado (M-9)	M1727	Cuba
10	1250	México-1	Blanco rosado (M-10)	Mj-1	México
11	1251	México-27	Morado claro (M-11)	Mj -27	México
12	1252	México-16	Morado claro (M-12)	Mj -16	México
13	1236	Jardín	Morado claro (M-13)	Jd	Cuba
14	1253	México-2	Morado claro (M-14)	Mj-2	México
15	1265	Cuarentena	Morado claro (M-15)	Cuarent	Saot. y Príncipe
16	1263	México 8	Rosado (M-16)	Mj-8	México
17	1264	Morada de México	Morado claro (M-17)	MMj	México
18	1237	Macal	Morado (M-18)	Macal	México
19	1233	Morada	Morado claro (M-19)	M	Cuba
20	1257	Morada-1	Morado (M-20)	M-1	Cuba
21	1254	México-3	Morado claro (M-21)	M-3	México

22	1234	Japonesa	Rosado (M-22)	Jp	Indonesia
23	1235	Rosada	Blanco rosado (M-23)	Ros	Cuba
24	1266	Cuarentena –1	Blanco rosado (M-24)	<i>Cuar.1</i>	<i>Saot. y Príncipe</i>
25	1258	Morada 1726	Morado claro (M-25)	M-1726	Cuba
26	1610	Morada –8	Morado claro (M-26)	M-8	Cuba
27	904	INIVIT-84	Morado claro (M-27)	INV-84	Cuba
28	905	Morada Cabaiguan	Morado claro (M-28)	MCab	Cuba
29	1593	Morada Jibacoa	Morado claro (M-29)	MJib	Cuba
30	1256	Blanqui-Morada	Blanco rosado (M-30)	BqM	Cuba
31	1474	Blanca Morada	Blanco rosado (M-31)	ADA	Cuba
32	1460	Morada Ceniza	Blanco cremoso(M-32)	MCz	Cuba

Tabla 4: Sistemas isoenzimáticos estudiados para el germoplasma analizado.

Material Vegetal	Sistemas proteicos
Plátanos (<i>Musa spp.</i>)	Peroxidasas, Esterasas, Polifenoloxidasas, Anhidrasa carbónica, Fosfatasas ácidas, Ascorbato oxidasas, Proteínas totales.
Malanga (<i>Xanthosoma spp.</i>)	Peroxidasas, Polifenoloxidasas, Esterasas, Proteinas totales.
Yuca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	Peroxidasas, Esterasas, Polifenoloxidasas, Anhidrasa carbónica, Fosfatasas ácidas, Ascorbato oxidasas, Malato deshidrogenasa, Formiato deshidrogenasa, Proteínas totales.

González, 2003

Tabla 5. Valores del Índice de Similitud de Vaughan y Denford para los sistemas isoenzimáticos y las proteínas totales en los clones de yuca analizados.

Clones	Campo- meristemas	Campo- embriogénesis	Meristemo- embriogénesis
'CEMSA 74-725'	0.815	0.820	0.914
'Señorita'	0.897	0.785	0.871
'CMC-76'	0.818	0.853	0.761

Tabla 6. Resultados de la prueba “t” de porcentajes para la comparación de los valores de Índice de Similitud en los clones de yuca analizados

'CEMSA 74-725'		C-M	C-E
	C-M	-	-
	C-E	0,054 NS	-
	M-E	1,250 NS	1,206 NS
'Señorita'		C-M	C-E
	C-M	-	-
	C-E	1,396 NS	-
	M-E	0,355 NS	1,035 NS
'CMC-76'		C-M	C-E
	C-M	-	-
	C-E	0,507 NS	-
	M-E	0,503 NS	1,068 NS

